



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CEILÂNDIA
CURSO DE FARMÁCIA**

MICHELLY RODRIGUES GONÇALVES

**AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL DE RATOS TRATADOS CRONICAMENTE
COM ÁGUA DO RIO DOCE PÓS-ROMPIMENTO DA BARRAGEM DE FUNDÃO
VIA ORAL**

CEILÂNDIA, DF

2016

MICHELLY RODRIGUES GONÇALVES

**AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL DE RATOS TRATADOS CRONICAMENTE
COM ÁGUA DO RIO DOCE PÓS-ROMPIMENTO DA BARRAGEM DE FUNDÃO
VIA ORAL**

Monografia de Conclusão de Curso apresentada como
requisito parcial para obtenção do grau de Farmacêutico,
na Universidade de Brasília, Faculdade de Ceilândia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Vivian da Silva Santos

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Fabiane Hiratsuka Veiga de Souza

CEILÂNDIA, DF

2016

MICHELLY RODRIGUES GONÇALVES

**AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL DE RATOS TRATADOS CRONICAMENTE
COM ÁGUA DO RIO DOCE PÓS-ROMPIMENTO DA BARRAGEM DE FUNDÃO
VIA ORAL**

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Vivian da Silva Santos (FCE/ Universidade de Brasília)
Orientadora

Prof. Dra. Mani Indiana Funez (FCE/ Universidade de Brasília)

Prof. Dr. Paulo Gustavo Barboni Dantas Nascimento (FCE/ Universidade de Brasília)

CEILÂNDIA, DF
2016

AGRADECIMENTOS

Àquele que me deu a vida, responsável por tudo o que me tornei, me chamou de filha nos momentos fáceis e difíceis e me acolheu em seus braços por toda a minha caminhada, Deus. Agradeço por nunca me deixar desistir e me proporcionar tudo o que me foi necessário para chegar até aqui, por me dar forças para seguir sempre em frente mesmo quando os obstáculos se mostraram enormes. Também agradeço a Nossa Senhora, minha mãe, por me acalantar e me envolver em seu manto, me conduzir, me amar e interceder ao Pai para que o melhor fosse feito em minha vida.

Aos meus pais Ronei e Neide, que fizeram o possível e o impossível para que todos os meus sonhos se realizassem. Que me deram todo apoio necessário, tanto emocional, financeiro, afetivo e psicológico para que meus objetivos fossem alcançados. Por todo amor que concederam ao longo da minha vida e principalmente nestes anos de curso. Por serem meus maiores incentivadores, exemplos de vida, de caráter, de dignidade, de dedicação e amor. À minha irmã Camila, por sempre me apoiar e acreditar no meu potencial, por se orgulhar de mim e compartilhar todos os momentos da minha vida.

A todos os meus familiares que torceram e sonharam comigo a conclusão dessa fase, avós, padrinhos, tios e primos. Em especial a minha Madrinha e avós que sempre me colocam em suas orações, e acreditam no meu potencial.

Aos meus amigos que me acompanharam nessa jornada, Ananda Gonçalves, Fernanda Diniz, Juliana Faria, Kaio Luís, Najra Alencar, Nathalia Rodrigues, Odair Silva, Stephanie Ramos e Suzana Cristina agradeço imensamente a companhia de todos os momentos, por estarem sempre ao meu lado, e a todos os outros que conheci e que contribuíram de alguma maneira na minha vida.

Aos meus colegas de pesquisa, que se tornaram grandes amigos e melhores companhias, Alan Nóbrega e Natália Carvalho, agradeço de todo coração, por serem meu porto seguro, me dando todo o auxílio, conselhos, descontração, companhia para todas as horas e força para prosseguir e pelo esforço oferecido ao longo deste ano de construção deste trabalho.

De forma especial, agradeço a minha orientadora, professora Vivian da Silva Santos, pelo aceite do convite de me orientar, pela oportunidade que me deu de participar do seu grupo de pesquisa em 2015 e 2016, por se esforçar para que eu

pudesse dar o melhor de mim, por me ensinar e se preocupar. Sua postura profissional e pessoal é um exemplo a ser seguido.

Sou grata aos professores Mani Indiana Funez e Paulo Gustavo Barboni Dantas Nascimento por participarem da banca examinadora e contribuírem com seus conhecimentos.

À Universidade Católica de Brasília por ceder o espaço e os animais para que este trabalho pudesse se realizar, e aos técnicos Rafael e Vinícius por sempre auxiliarem em tudo o que foi necessário aos experimentos.

À Universidade de Brasília/Faculdade de Ceilândia por proporcionar a oportunidade da realização desse sonho, ao corpo docente do curso de Farmácia, que pelo ensino e dedicação forma ótimos profissionais.

Agradeço imensamente a todos que me permitiram chegar à realização desta conquista. Concluo este curso com perspectivas e sonhos ainda maiores e com a certeza de que chegarei a qualquer lugar que eu almejar.

À todos vocês meus mais sinceros agradecimentos!

RESUMO

O processo de mineração tem grande importância econômica para o país, no entanto, pode causar sérios danos ambientais, principalmente no que diz respeito à desfiguração da paisagem. Neste contexto, o acidente em Mariana causou diversos prejuízos devido ao escoamento de mais de 70 milhões de m³ de lama de rejeitos da mineração, que atingiu de forma direta toda a população dos vilarejos próximos e os rios que se encontravam no curso do derramamento, entre eles o rio Doce, contaminando as suas águas, que em alguns casos é a única fonte hídrica dos moradores. Este trabalho se justifica então pela necessidade de avaliar os impactos desta água in vivo, devido a sua alta concentração de metais pesados, que podem causar neurotoxicidade, e pela preocupação dos cidadãos em consumi-la. Neste estudo, foram tratados dois grupos de ratos com água do rio Doce, Naque e Regência com relação à evolução de peso, consumo de água e comportamento no teste do nado forçado e no teste do campo aberto ao longo de 100 dias. Os resultados mostraram que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) no ganho de peso e consumo de água entre os grupos, sendo que estes seguiram o padrão mostrado na literatura. Além disso, nos testes comportamentais, apesar de haver diferença significativa em algumas variáveis não foi observado no geral efeitos comportamentais que justifiquem efeitos depressogênicos ou ansiogênicos, em nenhum dos grupos.

Palavras-chave: Rio Doce. Água. Ambiente. Mineração. Neurotoxicidade. Comportamentais

ABSTRACT

The mining process has great economic importance for the country, however, can cause serious environmental damage, especially with regard to landscape disfiguration. In this context, the Mariana accident caused a number of damages due to the disposal of more than 70 million m³ of tailings mud from the mine, which directly affected the entire population of the nearby villages and the rivers that were in the course of the spill, They the Doce river, contaminating its waters, which in some cases is the only water source of the residents. This work is justified by the need to evaluate the impacts of this water in vivo, due to its high concentration of heavy metals, which can cause neurotoxicity, and the citizens' concern to consume it. In this study, two groups of rats were treated with water from the river Doce, Naque and Regência in relation to weight evolution, water consumption and behavior in the forced swimming test and the open field test over 100 days. The results showed that there was no significant difference ($p > 0.05$) in the weight gain and water consumption between the groups, and these followed the pattern shown in the literature. Moreover, in behavioral tests, although there was a significant difference in some variables, behavioral effects that warranted depressogenic or anxiogenic effects were not observed in any of the groups.

Keywords: Sweet River. Water. Environment. Mining. Neurotoxicity. Behavioral

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Pontos de amostragem ao longo do Rio Doce e em alguns afluentes.....	4
Figura 2. Galão de água.....	17
Figura 3 – Mamadeira.....	17
Figura 4. Balança Filizola BP 15.....	19
Figura 5. Proveta 500 mL.....	19
Figura 6. Cabine de raspagem da marca Insight.....	20
Figura 7. Autoclave da marca primar EP120.....	20
Figura 8. Fotografia representativa do modelo do nado forçado.....	21
Figura 9. Fotografia representativa do modelo do campo aberto.....	22
Figura 10. Peso corporal e consumo de água dos animais.....	24
Figura 11. Gráficos nado forçado.....	25
Figura 12. Gráficos campo aberto.....	27

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Padrões de qualidade e de materiais inorgânicos na água.....	5
Tabela 2. Esquema de realização dos procedimentos com a quantidade de animais utilizados e tipo de tratamento por grupo.....	18
Tabela 3. Padrões de qualidade exigidos pela legislação e encontrados em expedição do GIAIA nos pontos Naque e Regência.....	23

LISTA DE SIGLAS

AMD	Drenagem Ácida Mineira
Al	Alumínio
As	Arsênio
Cd	Cádmio
CEUA	Comitê de Ética no Uso Animal
CdCl ₂	Cloreto de Cádmio
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
DBO	Demanda Bioquímica de Oxigênio
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DP	Doença de Parkinson
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EROS	Espécies Reativas de Oxigênio
EPM	Erro Padrão Médio
Fe	Ferro
GIAIA	Grupo Independente de Avaliação do Impacto Ambiental
GLU	Glutamato
Hg	Mercúrio
IARC	International Agency for Research on Cancer
IGAM	Instituto Mineiro de Gestão das Águas
MG	Minas Gerais
Mn	Manganês
Ni	Níquel
OD	Oxigênio Dissolvido
PIB	Produto Interno Bruto
QI	Quociente de Inteligência
Se	Selênio

SBNeC	Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento
TCA	Teste do Campo Aberto
TDAH	Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade
TNF	Teste do Nado Forçado
UCB	Universidade Católica de Brasília

SUMÁRIO

1	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	1
1.1	Contextualização do Problema.....	1
1.2	Efeitos Neurotóxicos Crônicos causados por Metais.....	6
1.3	Evidências de Neurotoxicidade pelo Consumo de Água Contaminada por Metais.....	6
1.4	Dados Comportamentais e Toxicologia de Metais.....	12
2	JUSTIFICATIVA.....	15
3	OBJETIVOS.....	16
3.1	Objetivos Gerais	16
3.2	Objetivos Específicos	16
4	MATERIAIS E MÉTODOS	17
4.1	Etapa pré-analítica.....	17
4.1.1	<i>Animais.....</i>	<i>17</i>
4.2	Etapa analítica	18
4.2.1	<i>Massa corporal dos animais ao longo do tratamento por grupo</i>	<i>18</i>
4.2.2	<i>Aferição do Peso e Volume da água consumida</i>	<i>18</i>
4.2.3	<i>Manejo.....</i>	<i>19</i>
4.2.4	<i>Limpeza das caixas</i>	<i>19</i>
4.2.5	<i>Teste comportamental Nado Forçado.....</i>	<i>20</i>
4.2.6	<i>Teste comportamental campo aberto.....</i>	<i>21</i>
4.3	Etapa pós-analítica	22
4.3.1	<i>Análise estatística</i>	<i>22</i>
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
5.1	Nado forçado	25
5.2	Campo Aberto	27
6	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	30
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31
8	ANEXO 1	39

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Contextualização do Problema

O processo de mineração é de relevante importância para a economia do Brasil, sendo responsável pela ocupação de cerca de 5% do PIB industrial além de gerar lucros advindos da exportação de minérios brutos, como o ferro. Este setor se destaca ainda pela geração de emprego e por consequência, na melhora da qualidade de vida e bem estar das pessoas (NETO et al., 2014; SILVA, 2007; IBRAM, 2014¹).

Minas Gerais é o estado brasileiro com maior representatividade na mineração, sendo responsável pela extração de mais de 160 milhões de toneladas por ano de minério de ferro e é o responsável por aproximadamente 35 % da produção de minérios em geral do país (IBRAM, 2014²; VIEIRA, 2011; RODRIGUES, COSTA, 2015).

A extração de minérios produz resíduos, chamado de rejeito, e para obtenção dos elementos de interesse econômico e seu armazenamento pode ser feito de três formas: em superfície, em escavações subterrâneas e em ambientes subaquáticos. A disposição em superfície é a mais aplicada, podendo o material ser disposto em barragens ou diques; em pilhas de rejeito se o material estiver na forma sólida; ou na própria mina, em áreas já lavradas ou minas abandonadas. Os diques normalmente recebem a denominação de barragens quando são construídos em áreas planas ou com pouca inclinação, ou quando construídos em vales (SANTOS, 2010). Já o descarte destes pode ser feito de duas formas: líquida (polpas), sendo o seu transporte feito em tubulações através de bombas ou por gravidade; ou sólida (pasta ou granel), com o transporte feito por caminhões ou correias transportadoras (SANTOS, 2010; DUARTE, 2008).

De acordo com LOTTERMOSER (2007) as barragens de contenção em sua elaboração devem ter como prioridades: a estabilidade em longo prazo contra a erosão e movimento de massas, a prevenção da contaminação ambiental do solo e da superfície das águas e proporcionar a reutilização da terra após a utilização da área. Além disso, o represamento dos rejeitos deve ser feito de forma segura e estável. No entanto, podem ocorrer erros durante esses processos, especialmente no que diz respeito à estabilidade, levando a graves problemas, entre eles o

rompimento da mesma, gerando diversos prejuízos, tanto econômicos quanto ambientais.

Neste contexto, é notável que a relação entre as formas de descarte de rejeitos de mineração e o meio ambiente seja capaz de causar sérios danos. De acordo com Mechi e Sanches (2010), os principais prejuízos dizem respeito à desfiguração da paisagem, supressão da vegetação ou impedimento de sua regeneração, redução ou destruição de hábitat, afugentamento e morte de espécimes da fauna e da flora terrestres e aquáticas, sendo a última devido à sedimentação nos sistemas fluviais, causando extinção de espécies, interrupção de corredores de fluxos gênicos e de movimentação da biota, entre outros. No que se refere à ação humana são pertinentes os impactos à saúde causados pela poluição sonora, do ar, da água e do solo (LOTTERMOSER, 2007).

Além dos danos citados acima a contaminação por metais como antimônio, arsênio, cádmio, cobre, chumbo, urânio, zinco, alumínio, manganês, entre outros, causada pelos rejeitos e pelas águas de drenagem ácida mineira (AMD) que se origina a partir da reação autocatalítica de oxidação de sulfetos minerais, é de suma importância, pois podem desencadear efeitos tóxicos, corrosivos ou radioativos, ou a combinação destes, tanto quando ingeridos, como quando inalados (LOTTERMOSER, 2007).

Um exemplo deste impacto da atividade mineradora no ambiente em que se insere foi o rompimento da barragem de Fundão pertencente à Samarco em Mariana-MG no dia 5 de novembro de 2015 que causou sérios prejuízos. De acordo com PORTO (2016) o ocorrido ficará marcado como uma das maiores tragédias socioambientais do país. Escoaram-se mais de 70 milhões de metros cúbicos de lama de rejeitos de mineração de ferro. Além de atingir outra barragem, chamada de Santarém e destruir vilarejos como Bento Rodrigues, que teve mais de 80% de suas edificações cobertas além de ter causado graves impactos estruturais também no distrito Paracatu de Baixo, a lama percorreu 663 km ao longo dos rios Gualaxo do Norte, Carmo e Doce, chegando à foz deste e afetando seu ecossistema marinho em área de reprodução de espécies marinhas.

O desastre causou vários danos, tais como: morte de trabalhadores de mineração, deslocamento e morte de cidadãos das cidades afetadas, devastação das cidades, destruição de áreas agrícolas, pastagens, áreas de preservação permanente e flora nativa da Mata Atlântica (mais de 15 km²), mortalidade da biota

aquática e terrestre e fauna dependentes de água, interrupção da geração de energia elétrica, abastecimento de água, pesca, turismo, entre outros (SEGURA et al, 2016).

Na bacia do rio, 11 toneladas de peixes mortos foram recolhidas e talvez cinco espécies tenham sido extintas, com décadas sendo estimadas para a recuperação da área (PORTO, 2016). Além disso, pesquisa da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) revelou que a área de 1.430 hectares atingida pela lama nos municípios de Mariana, Barra Longa e Rio Doce não apresenta mais condições para o desenvolvimento de atividades agropecuárias, pois a camada superior depositada impede a fertilidade do solo e demorará anos de investimento para sua recuperação.

A população ainda está muito temerosa quanto ao consumo da água proveniente dos locais afetados pelo acidente e a procura de respostas para perguntas como: “a água está contaminada por metais pesados?”, “quais os efeitos dessa lama para a saúde?”, “os peixes do mar podem ser consumidos?”, ainda assombram os moradores afetados. Muitos laudos foram apresentados e duas posições antagônicas se estabeleceram: a empresa e órgãos estatais afirmando que a água tratada não oferece riscos à saúde, e de outro lado, pesquisadores independentes e organizações ambientalistas que afirmam a existência de metais pesados na água do rio (ORGANON, 2015).

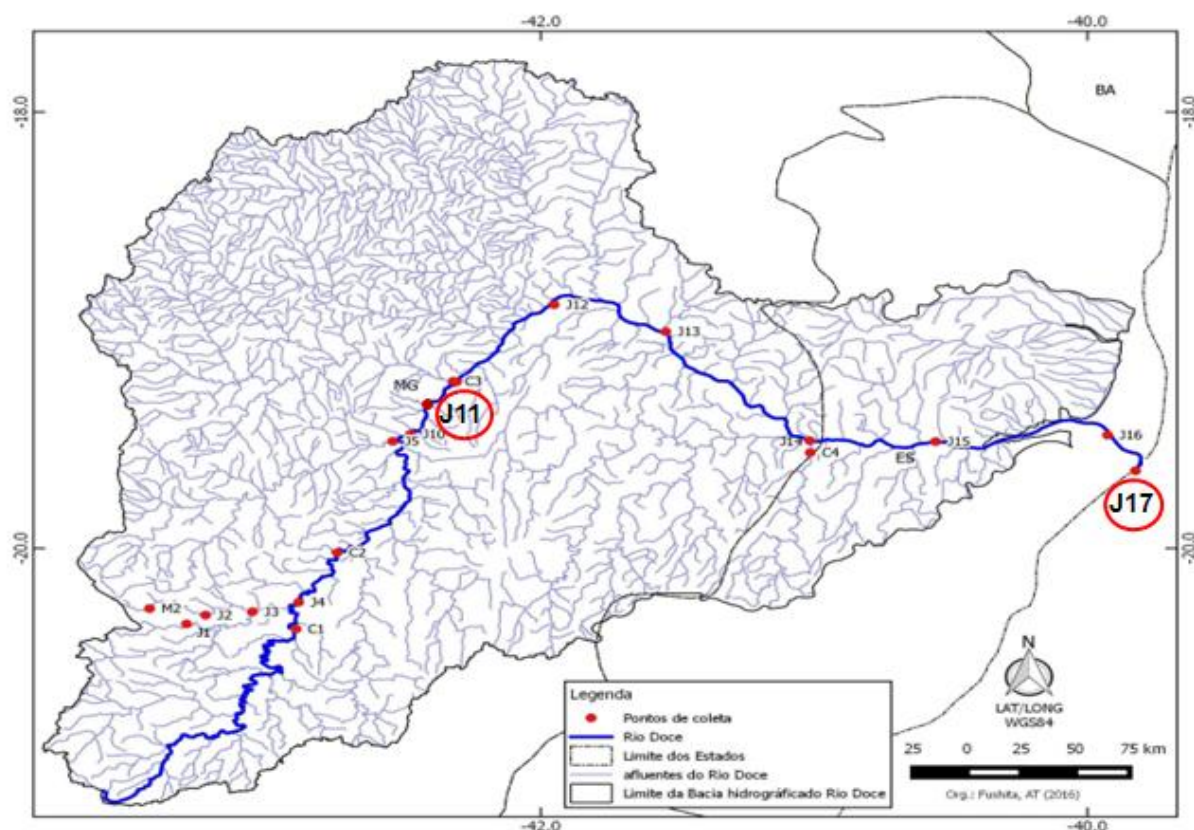


Figura 1 - Pontos de amostragem ao longo do Rio Doce (setas vermelhas) e em alguns afluentes (setas em azul). M2 – Rio Gualaxo do Norte à montante do despejo; J1 – Rio do Carmo à jusante do despejo e não impactado pelo rejeito; J2 – Rio Gualaxo do Norte à jusante do despejo; J3 – Rio do Carmo à jusante do despejo; J4 à J17 – Rio Doce (da cidade de Rio Doce até a foz em Regência); C1 – Rio Piranga; C2 – Rio Piracicaba; C3 – Rio Santo Antônio; C4 – Rio Guandu. Mapa: A. Terumi Fushita – Universidade Federal de São Carlos – Laboratório de Análise e Planejamento Ambiental (LAPA). **Fonte:** GIAIA – 2ª Expedição à Bacia do Rio Doce (30/03 a 08/04/16)

Entre os vários relatórios realizados, como o do IBAMA, do Ministério Público, da Marinha, entre outros, houve também os do GIAIA (Grupo Independente de Avaliação do Impacto Ambiental), onde foram feitas expedições para coleta de água nos pontos mais afetados, mostrados na figura 1 e os dados foram publicados no relatório de análises físico-químicas do Rio Doce e afluentes (Análises realizadas *in situ*) – 2ª Expedição à Bacia do Rio Doce (30/03 a 08/04/16) e relatório-técnico de determinação de metais na bacia do rio doce (período: dezembro-2015 a abril-2016)

Nestes relatórios foram observadas concentrações elevadas de metais em

diversos pontos do rio, inclusive nos tratados neste trabalho, que foram Naque e Regência. Dentre os metais encontrados acima do permitido pela legislação em toda a extensão da Bacia do Rio Doce, os encontrados nos pontos estudados neste trabalho foram: alumínio, arsênio, cádmio, ferro, manganês, níquel e selênio, sendo que para o alumínio e o ferro totais não existe limite estabelecido pela mesma. Além disso, também foi apresentada alteração no padrão de qualidade físico-químico de turbidez, estando acima do permitido, e este pode ser explicado devido à maior presença de sólidos em suspensão, tais como partículas inorgânicas (areia, silte, argila) e de detritos orgânicos, como algas e bactérias, plâncton em geral, entre outros, como apresentado na tabela 1.

Tabela 1. Materiais inorgânicos e padrões de qualidade exigidos pela legislação e encontrados com alteração em expedição do GIAIA nos pontos Naque e Regência

Metais	CONAMA 357/2005 (mg/L)	J11- Naque		J17- Regência	
		Expedição 1 (mg/L)	Expedição 2 (mg/L)	Expedição 1 (mg/L)	Expedição 2 (mg/L)
Al Dissolvido	0,1	<0,02	<0,02	Não coletada	<0,02
Al Total	-	8,60±1,42	2,27±1,26	4,16±0,29	0,93±0,01
As Total	0,01	<0,002	<0,002	0,02±0,01	0,008±0,002
Cd Total	0,001	0,004±0,002	<0,001	0,007±0,004	<0,001
Fe Dissolvido	0,3	0,043±0,004	<0,01	Não coletada	<0,01
Fe Total	-	25,49±16,76	6,69±0,24	4,28±0,37	1,33±0,02
Mn Total	0,1	1,21±0,39	0,142±0,001	0,160±0,001	0,027±0,001
Ni Total	0,025	0,05±0,01	<0,01	0,05±0,01	<0,01
Se Total	0,01	<0,01	<0,01	0,03±0,01	<0,01
Turbidez	Até 40 UNT	136,67 ± 3,51 UNT		36, 33± 12,86 UNT	

Fonte: GIAIA, 2016; CONAMA 357/2005.

A legislação que estabelece os parâmetros de concentração de metais e de qualidade físico-química da água é a resolução CONAMA 357 de 2005, que também trata das subdivisões dos tipos de água, entre elas a água doce, como sendo aquela com salinidade igual ou inferior a 0,5 %. Entre os fatores de qualidade observados para água do tipo 2 (como a do Rio Doce) estão: a não verificação de efeito tóxico crônico a organismos, a ausência virtual de materiais flutuantes, a presença de corantes provenientes de fontes antrópicas que não sejam removíveis por processos convencionais, o limite de coliformes termotolerantes ou a presença de E. Coli, cor verdadeira, pH e turbidez, entre outros (CONAMA 357 de 2005).

Vários dos metais em excesso aqui encontrados podem desencadear diversos efeitos neurotóxicos e neurocomportamentais importantes, como destruição de neurônios, ansiedade e depressão, por exemplo. Esse fato torna ainda mais relevante a avaliação da toxicidade desta água e a realização de testes que esclareçam as consequências da exposição à mesma. Além disso, estes estão em coexposição o que pode agravar ou mesmo atenuar estes efeitos.

Em outros relatórios como o realizado pela equipe técnica da expedição Rio Doce da Fundação SOS Mata Atlântica, do IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis), do IGAM (Instituto Mineiro de Gestão das Águas) e de outros órgãos governamentais também foram encontrados índices acima do preconizado para turbidez, manganês, alumínio, ferro e níquel.

Em estudo realizado por SEGURA et al (2016) comparando as concentrações de Fe e Mn em água residual (afetada pela lama) em relação à legislação brasileira para corpos de água, estes estavam cerca de 4 a 1,5 vezes mais elevada que o permitido.

1.2 Efeitos Neurotóxicos Crônicos causados por Metais

A preocupação e receio da população em consumir a água proveniente do Rio Doce são claramente justificáveis uma vez que diversos estudos na literatura demonstraram a correlação de ingestão de água contaminada por metais e efeitos diversos. As principais vias de exposição humana aos metais são a inalação, ingestão e absorção através da pele, no entanto a biodisponibilidade destes é dependente de vários fatores como a maneira e o tempo de exposição, a capacidade de absorção, a presença de outros metais, a idade e o estado de desenvolvimento corpóreo (CORTECCI, G., 2016).

O alumínio (Al) é um metal não essencial e apresenta efeitos crônicos e neurotóxicos importantes, sendo que em animais pode afetar a permeabilidade da barreira hematoencefálica, a atividade colinérgica, as vias de transdução de sinal, pode desencadear peroxidação lipídica, prejuízo no ciclo glutamato-glutamina, e causar interferência no metabolismo de elementos essenciais (POHL, H., RONEY, N., ABADIN, H., 2016)

Em contraste com alguns estudos que vêm desacreditando a participação deste metal na Doença de Alzheimer, principalmente por causa da escassez de testes confiáveis, dados sobre sua especiação química, e uma compreensão

incompleta da sua complexidade química em sistemas biológicos (ZATTA et al, 2009), a pesquisa de DRAGO, D. et al (2008) concluiu que os efeitos tóxicos celulares produzidos pelo agrupamento de proteínas beta amiloides com alumínio foram significativamente mais pronunciados do que os obtidos com agrupamento destas sozinhas. Este complexo organometálico estável formado por Al - β amiloide, aumenta a hidrofobicidade da superfície desta molécula proteica dramaticamente devido a alterações conformacionais produzidas por este e outros metais, levando à sua maior permeabilidade na barreira hematoencefálica.

O arsênio (As) é um metalóide tóxico, sendo classificado pela International Agency for Research on Cancer (IARC) como “carcinogênico aos humanos (grupo I)” (BRUNTON et al, 2012). Uma longa exposição a compostos inorgânicos de arsênio, através da ingestão de água, pode conduzir a várias doenças tais como: conjuntivite, hiperqueratose, hiperpigmentação, doenças cardiovasculares, distúrbios no sistema nervoso central e vascular periférico, câncer de pele e gangrena nos membros (BARRA, C.M, SANTELLI, R.E, ABRÃO, J.J ,2000)

Um mecanismo proposto para a neurotoxicidade deste elemento é a interferência com proteínas do citoesqueleto e hiperfosforilação (VAHIDNIA A. et al, 2007). Em conformidade com esse mecanismo GILSON et al (2002), com cultura de células demonstrou que a exposição ao arsênio aumenta a concentração de proteína β -amilóide e induz a hiperfosforilação da proteína tau, que estabiliza os microtúbulos, causando estresse oxidativo, inflamação, disfunção das células endoteliais, e angiogênese.

Os principais efeitos crônicos do As manifestam-se semanas após a primeira exposição, sendo muito comum o câncer de pele e o comprometimento do fígado, e neurologicamente, a neuropatia periférica e central. Estas podem causar prejuízos às funções neurológicas, tais como a aprendizagem, memória de curto prazo e concentração. A neuropatia periférica que pode durar vários anos ou até mesmo ao longo da vida, pode levar a uma rápida e ascendente fraqueza grave, semelhante à síndrome de Guillain-Barré, exigindo ventilação mecânica, além poder levar a axonopatia distal com desmielinização, esta é comum em pessoas cronicamente expostas à água contaminada com As (VAHIDNIA A. et al, 2007; KLAASSEN, C. D., WATKINS III, J. B., 2012).

A coexposição do As com outros metais e até mesmo outros compostos e substâncias é relevante, como exemplo, ensaio em crianças com média de 9 anos

de idade usando as concentrações de chumbo e arsênio no cabelo como biomarcadores de exposição relataram uma interação que potencializou o efeito de diminuição das competências em leitura e escrita, causados pelo arsênio (MOON C, MARLOWE M, STELLERN J, ERRERA J, 1985). Em ratos foi observada que coexposição ao arsênio e nicotina provoca aumento do estresse oxidativo em comparação com animais normais, aumentando espécies reativas de oxigênio cerebrais (JAIN, A.; AGRAWAL, S.; FLORA, S. J. S., 2015).

A exposição de embriões de peixe-zebra à arsênio e atrazina causa maiores graus de anormalidades, tais como escoliose, retardamento do crescimento, formação de edema pericárdico e no saco vitelínico, além de que a combinação destes causa mais estresse oxidativo a partir da peroxidação lipídica, redução dos níveis de glutathione e da atividade da catalase, que individualmente (ADEYEMI, J. A., DA CUNHA, M. J. A., BARBOSA, F., 2015).

O cádmio na intoxicação crônica tem efeitos como a doença pulmonar crônica obstrutiva e enfisema, além de distúrbios crônicos dos túbulos renais, problemas cardiovasculares e no sistema esquelético, cuja gravidade é proporcional ao tempo e à intensidade da exposição, devido ao seu caráter de agente tóxico cumulativo (CARDOSO, L. M. N., CHASIN, A. A. M., 2001).

Devido à sua alta permeabilidade na barreira hematoencefálica, perturbações neurológicas, tais como dificuldades de aprendizagem e hiperatividade em crianças podem ocorrer após exposição ao mesmo. O mecanismo de indução destes danos neurológicos é parcialmente conhecido. Este metal induz o estresse oxidativo, levando a produção de radicais livres, com aumento da peroxidação de lipídios, a depleção de sulfidrila, alteração na homeostase do cálcio, disfunção das defesas antioxidantes e danos no DNA, além de danos em proteínas das células neuronais e subsequentemente neurodegeneração (SHAGIRTHA, K., 2011; MONEIM et al., 2014).

. O potencial neurotóxico deste em animais experimentais é principalmente devido à deterioração das transmissões catecolaminérgicas e serotoninérgicas. A produção de radicais livres pode, pelo menos em parte, associada com a diminuição da atividade da acetilcolinesterase do cérebro, que leva à acumulação de acetilcolina, causar hiperatividade colinérgica, convulsão e estado de mal epilético (SHAGIRTHA, K., 2011). Em concordância DONG (2015), observou que ratos intoxicados com cádmio (5 mg / kg / dia) durante 4 semanas tiveram significativa

redução nos níveis da AChE (acetilcolinesterase), obtiveram elevação nos níveis de marcadores de estresse oxidativo, além de uma significativa redução dos níveis de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos no tecido cerebral dos mesmos.

O ferro (Fe) pode desempenhar função no desenvolvimento de doenças cardiovasculares, além de que pode agir como um catalisador para produzir radicais livres, resultando em arteriosclerose e doenças cardíacas isquêmicas. Algumas doenças neurodegenerativas associadas com o metabolismo anômalo do ferro no cérebro incluem neuroferritinopatia, aceruloplasminemia e manganismo (KLAASSEN, C. D.; WATKINS III, J. B, 2012).

O cérebro apresenta várias demandas para o ferro, pois o mesmo está envolvido na respiração mitocondrial, na síntese de DNA e de neurotransmissores e mielina. O comprometimento da homeostasia celular de metais pode iniciar o processo de neurodegeneração por vários mecanismos, onde o estresse oxidativo figura como o mais compreendido até o momento. Não obstante, outros mecanismos estão relacionados como a diminuição da produção de metaloproteínas, a ativação microglial, levando a neuroinflamação, além da agregação e formação de emaranhados neurofibrilares de alpha-sinucleína (CALOU, I. B. F; CERQUEIRA, G.S, SIQUEIRA, R. M. P., 2015)

O manganês (Mn) é um elemento essencial ao organismo em baixas quantidades, no entanto quando em doses elevadas apresenta alta toxicidade. Wegrzynowicz e colaboradores (2013) citou que a exposição prolongada, ocupacional ou ambiental ao manganês, leva ao manganismo caracterizado por sintomas semelhantes aos observados na doença de Parkinson (DP) e concluiu que houve alterações em proteínas responsáveis pela síntese da glicose e, consequentemente, do glutamato (GLU), já que esse neurotransmissor não atravessa a barreira hematoencefálica e por isso deve ser sintetizado no tecido nervoso a partir da glicose e outros precursores.

O estudo de Erikson e colaboradores (2007) descreve que a deposição de Mn no cérebro tem implicações potencialmente importantes para o desenvolvimento neurológico em longo prazo em crianças expostas e em ratos recém-nascidos, além de decréscimo de glutathione nos ratos. Além disso, esse estudo relatou o estresse oxidativo como um mecanismo pelo qual o Mn pode ser citotóxico, sendo a oxidação da dopamina por Mn um deles, devido à capacidade desse metal de acumular-se em regiões cerebrais ricas em dopamina de roedores e primatas, e o outro, a

interferência com a respiração adequada nas mitocôndrias, conduzindo assim a uma produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROS) e mesmo em pequenas quantidades sua forma trivalente pode provocar a formação de EROS.

A coexposição do Mn com cádmio é relevante avaliando que este provoca efeito sinérgico produzindo maiores alterações no conteúdo de amins biogênicas e ácido acético 5-hidroxiindol do que uma única exposição individual a qualquer dos metais (POHL, H., RONEY, N., ABADIN, H., 2016)

Compostos de níquel que são inalados ou ingeridos a partir do ambiente podem conduzir a vários efeitos tóxicos nos vários órgãos, incluindo o pulmão, fígado, rim e cérebro. O sistema nervoso é um dos principais órgãos alvo da toxicidade do níquel. A exposição crônica a esse metal causa uma variedade de sintomas neurológicos, como dores de cabeça, tonturas, cansaço, letargia e ataxia, sendo que no estudo de Das et al. (2008) foram observados em tratamento crônico de ratos letargia, ataxia e prostração (HE et al., 2011).

Além disso, o mecanismo sugerido de neurotoxicidade subjacente de níquel em células neuronais é devido ao estresse oxidativo e disfunção mitocondrial. O sistema nervoso é particularmente sensível a estresse oxidativo e disfunção mitocondrial, como resultado da sua elevada necessidade de energia e de elevado teor de lipídeos (HE et al., 2011).

1.3 Evidências de Neurotoxicidade pelo Consumo de Água Contaminada por Metais

Trabalhos de MARTYN et al (1989) e de ALTMANN et al (1999) reforçam a ideia de que o Al esteja envolvido na causa da doença de Alzheimer, sendo que o primeiro mostrou que as taxas da doença em pessoas com idade inferior a 70 anos provenientes de oitenta e oito distritos do condado, dentro da Inglaterra e País de Gales estavam relacionadas com as concentrações médias de Al presentes nos suprimentos de água potável ao longo da década anterior ao estudo, sendo que o risco da doença foi 1,5 vezes maior nos distritos onde a concentração média deste excedeu 0,11 mg/L, que é semelhante a concentração deste metal na água analisada neste trabalho. Já o segundo, que teve duração de 10 anos acompanhou a contaminação acidental com Al em água potável em Camelford (Cornwall, UK), do estudo anterior, que provocou nos moradores expostos vários sintomas relacionados

com deficiências cerebrais, tais como perda de concentração e memória de curto prazo.

No estudo de WASSSERMAN (2007), realizado com crianças de Bangladesh, a exposição a arsênio, na concentração de 0,10 a 864 $\mu\text{g/L}$ com média de 120,1 μg e manganês na concentração de 1.302 $\mu\text{g/L}$, a partir da ingestão de água proveniente de poços artesianos, foi bem superior ao máximo recomendado de contaminantes leves pela organização mundial da saúde (OMS) e foi associada com as contagens reduzidas em medidas de função intelectual (QI). Corroborando este estudo, NAHAR et al (2014) continuou este estudo corroborando que a exposição a elevadas concentrações de As, reduz significativamente o percentual médio de QI, feito na mesma localidade.

Já para a exposição ao Mn WASSERMAN realizou estudos em 2006 e 2011, também em Bangladesh com crianças, sendo que Estudos de WASSERMAN et al realizados em 2006 e 2011 em Bangladesh com crianças altamente expostas à água da torneira contaminada com Mn identificaram associações com menores escores de QI, e prejuízos na capacidade de raciocínio e trabalho de memória. Fazendo relação com estes resultados, estudo de OULHOTE, Y. et al (2014) relatou associação de níveis elevados de exposição ao manganês com pior desempenho da memória, atenção e funções motoras de crianças de Quebec (Canadá), além de ter encontrado associação entre exposição a este metal em três indicadores (Na água da torneira, no cabelo e na água de beber com concentração de 8,2 $\mu\text{g/L}$ de Mn [menor que o permitido pela legislação brasileira vigente e encontrado neste trabalho]), com menores escores de QI, corroborando os achados de BOUCHARD, M. et al (2011), que encontrou essa mesma associação com o mesmo grupo de crianças.

Em uma coorte realizada com crianças no México com idades entre seis e sete anos, que ingeriram água com alta concentração de As de forma crônica (não foi medida no estudo), e tiveram a urina com maior concentração do mesmo, apresentaram menores pontuações nas medidas de linguagem e vocabulário e uma modesta associação com comportamento hiperativo usando o índice de transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH) (ROY A. et al, 2011). Respalando esse achado GONG, G. et al (2011) demonstrou que a ingestão de água com concentração < 10 $\mu\text{g/L}$ desse metal (menor que o permitido pela legislação brasileira vigente e encontrado neste trabalho), em adultos entre 40 e 94 anos sob

essa mesma exposição foi significativamente correlacionada com a disfunção cognitiva. Além disso, pontuações mais pobres na cognição global, velocidade de processamento, e memória imediata também foram encontradas, e estes déficits em particular, têm sido associados com a doença de Alzheimer (GONG, G. et al, 2011).

Foi realizada análise em três áreas do noroeste do Peloponeso, na Grécia, onde a concentração de Mn em água de beber era menor que a permitida pela legislação brasileira e a encontrada neste trabalho, sendo de 3,6-14,6 pg/L na área A, na área B de 81,6-252,6 pg/L e área C onde as concentrações de Mn variaram a entre 1800-2300 pg/L mostrou que houveram distúrbios neurológicos provocados por manganês ingerido na água (KONDAKIS, 1989). Em concordância com esses resultados BOUCHARD, M. et al (2007) realizou estudo com crianças de uma pequena comunidade (2.500 habitantes), localizada a 130 km ao norte de Montreal, em Quebec, no Canadá, onde a água de abastecimento é conhecida por ser contaminada por Mn e demonstrou que as crianças que viviam nestes locais tiveram maiores concentrações do mesmo no cabelo, sendo associado a um aumento dos comportamentos hiperativos e transgressores na sala de aula.

Em coexposição em tratamento feito com gestantes que ingeriram água contaminada com baixa, moderada e alta concentração de manganês e ferro foi indicada relação de exposição-resposta, indicando retardo do crescimento fetal e baixo peso ao nascer. Estes efeitos estariam associados com a biotransformação de xenobióticos e geração de radicais livres, que resulta em estresse oxidativo (GRAZULEVICIENE, R. et al., 2009).

1.4 Dados Comportamentais e Toxicologia de Metais

O nado forçado é um teste com boa validade preditiva, ou seja, possui boa capacidade de prever o efeito terapêutico de tratamentos (POSSAMAI, 2013) e é realizado com intuito de verificar efeitos antidepressivos, mas também tem sido usado para avaliar os mecanismos neurológicos envolvidos na depressão.

Nesse teste, observam-se ratos quando são forçados a nadar em um espaço restrito de onde eles não podem escapar. Observa-se que depois de algum tempo o animal acaba cessando aparentes tentativas de escapar e torna-se imóvel, além de iniciar pequenos movimentos necessários para manter a cabeça acima da água. Sugere-se que esta imobilidade comportamental característica e prontamente identificável reflete um estado de desespero do rato e variados agentes

antidepressivos podem reduzir a imobilidade (PORSOLT et al ,1977; FUNCHAL, 2014).

O campo aberto é um modelo utilizado para avaliar o efeito ansiolítico ou mesmo ansiogênico de substâncias. Esse teste foi desenvolvido por HALL (1934) sugerindo que a defecação e a atividade motora do animal no modelo indicam o estado emocional do mesmo. Este é realizado em uma arena circular ou quadrada cercada por paredes de forma a evitar a fuga do animal. O assoalho é totalmente subdividido em pequenos quadrados, utilizados para quantificar a atividade locomotora do animal. Alta defecação e baixa atividade locomotora estariam relacionadas à ansiedade, além de que a atividade locomotora no centro do modelo seria um indicativo mais específico da mesma, enquanto na periferia do aparato seria indicativo da locomoção normal do animal.

Em relação ao alumínio, no estudo de DI PAOLO, C. et al (2014) onde foram estudados fatores para o desenvolvimento da doença de Alzheimer não foram observados efeitos da combinação de lactato de alumínio e citrato sobre a atividade geral de ratos no labirinto aquático de Morris, e a exposição prolongada Al durante o desenvolvimento ou em adultos mostrou não afetar os níveis de atividade em roedores. No entanto, ratos geneticamente modificados que receberam lactato de alumínio e ácido cítrico mostraram a pior realização da tarefa entre todos os grupos o que demonstra dificuldade de aprendizagem.

O estudo de FARHAT et al (2016) mostrou que os animais tratados com alumínio tiveram significativamente menor memória de reconhecimento para o objeto novo, em comparação ao grupo controle no teste de reconhecimento de objeto novo e no teste de preferência de novidade social mostrou que o tratamento de alumínio resultou na interação social prejudicada, sendo que este levou os animais a passarem mais tempo sentados no canto da caixa de teste demonstrando pouca interação com o outro rato ou com a gaiola vazia. Além disso, os animais não puderam discriminar entre ratos familiares e estranhos, pois passaram o mesmo tempo com rato estranho e conhecido na interação social.

A exposição precoce ao cádmio pode induzir efeitos comportamentais e neurotóxicos em ratos, incluindo uma diminuição da atividade locomotora ou um aumento de comportamento de ansiedade semelhante, mas pode também provocar depressão (GAGNAIRE B. et al, 2011).

Enquanto o estudo de KAMEL, M. M et al (2011) demonstrou aumento da ansiedade de animais tratados com cloreto de cádmio (CdCl_2) dissolvido em água potável da torneira no teste comportamental de T elevado, HAIDER et al (2014) encontrou efeitos depressogênicos após a administração a curto prazo de cádmio em três doses, de 1, 2 e 3 mg/kg com uma redução significativa na atividade locomotora no teste do campo aberto, uma diminuição do número de entradas e tempo gasto no compartimento iluminado da caixa do teste de transição claro e escuro, e também causou um aumento acentuado no tempo de imobilidade e latência de escape no teste do nado forçado e no teste de Labirinto Aquático de Morris, respectivamente.

Com relação ao manganês, no estudo de YAMAGATA (2016) realizado pelo nosso grupo foi obtido como resultado no tratamento de ratos por via intraperitoneal nas doses de 1 mg/kg e 5 mg/kg de manganês a produção de efeito pró-depressivo, observando os modelos nado forçado e campo aberto, pois promoveu um aumento do tempo de imobilidade quando comparado com o controle positivo do experimento, que apresentou um efeito antidepressivo conhecido e, nesse modelo, induz uma diminuição no tempo de imobilidade, além de variação da atividade exploratória no campo aberto, resultando em hipoatividade com a dose mais alta, sugerindo um possível dano motor, principalmente em fêmeas.

Com resultados semelhantes SARITHA, K. et al (2014) mostrou que ratos expostos à água com cloreto de manganês apresentaram hiperatividade nos primeiros cinco minutos no campo aberto, o que indica alterações emocionais, especificamente um efeito ansiolítico. Além disso, houve aumento do tempo passado no centro em relação à periferia da arena que reforça o efeito ansiolítico. Também houve diminuição significativa na função muscular, particularmente a força muscular. Ainda se observou aumento significativo no tempo de imobilidade, com uma diminuição concomitante na natação e escalada no teste de natação forçada, o que possibilita inferir prejuízo na locomoção ou depressão.

A toxicologia é uma ciência relativamente recente, principalmente na sua relação com testes comportamentais, pois estes foram criados para estudo de fármacos, e, portanto, para avaliar o efeito toxicológico ou adverso destes, o que gera muitas limitações quanto à comparação dos resultados das pesquisas, devido à dificuldade na padronização de tempo de tratamento dos animais e as vias de exposição, sendo que a via oral é a mais incomum.

2 JUSTIFICATIVA

Esse estudo se justifica pela necessidade de se avaliar os possíveis efeitos neurocomportamentais e neurotóxicos em organismos vivos causados pelos metais pesados que foram escoados para o rio Doce, com os rejeitos provenientes do rompimento da barragem de fundão em Mariana-MG, e principalmente para observar os efeitos causados pela coexposição destes, já que esta pode exacerbar ou provocar efeitos diferentes do que é visto com metal isolado. Além disso, o ocorrido foi um problema atual e que mesmo já tendo um ano ainda não teve suas causas e consequências bem esclarecidas.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos Gerais

Avaliação de peso corporal e consumo de água de ratos machos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*, var. albinus) e exposição dos mesmos a testes comportamentais de nado forçado e campo aberto, após a ingestão de água do Rio Doce.

3.2 Objetivos Específicos

-Avaliar o consumo de água e o peso corporal dos animais ao longo do tratamento.

- Avaliar o tempo que o animal levou para ficar imóvel (latência) e o tempo de imobilidade, bem como o número de bolos fecais e outras variáveis, em animais submetidos ao modelo do nado forçado, utilizado para avaliar efeitos relacionados à depressão.

-Avaliar a frequência de cruzamentos (no centro e na periferia), levantamentos, tempo e frequência de autolimpeza, número de bolos fecais, a latência para o primeiro movimento e outras variáveis em animais submetidos ao modelo do campo aberto, utilizado para avaliar efeitos relacionados à ansiedade.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Etapa pré-analítica

Foi realizada coleta de água dos pontos J11 (Naque) e J17 (Regência) do Rio Doce, próximo à cidade de Rio Doce – MG, após o rompimento da barragem de Fundão, de acordo com uma determinação e quantificação dos metais e posterior planejamento para a escolha de um ponto com maior concentração dos mesmos feitos pelo GIAIA- Grupo Independente de Avaliação de Impactos Ambientais, como mostrado na figura 1. Além disso, foi utilizada água de abastecimento da torneira do Biotério do Laboratório de Processos Básicos e Psicologia da Universidade Católica de Brasília- UCB para o tratamento dos animais do grupo controle. Sendo que água foi utilizada in natura, sem nenhum processo de filtragem e armazenada em galões de plástico PVC descontaminados, e depois transferida para mamadeira dos animais, como nas figuras 1 e 2.



Figura 2 – Galão de água



Figura 3 - Mamadeira

4.1.1 Animais

Foram utilizados 15 ratos *wistar* machos da espécie *Rattus norvegicus*, provenientes do Biotério do Laboratório de Processos Básicos e Psicologia da Universidade Católica de Brasília- UCB (Brasília, DF, Brasil), mantidos em salas com estantes climatizadas, em ciclos de claro/escuro 12h/12h (as luzes acendem às 6h), luz com intensidade entre 250 e 500 LUX a 76cm do piso do ambiente, sob temperatura controlada de $22^{\circ}\text{C} \pm 2$. Foram mantidos individualmente em caixas de polietileno com maravalha e com alimento e água *ad libitum*. Foi realizado de 100

dias, que corresponde a um tratamento crônico (KLAASSEN, C. D., WATKINS III, J. B., 2012). Os animais foram divididos em 3 grupos de 5 animais. Estes tiveram manejo realizado 2 vezes por semana, onde foram aferidos a massa corporal do animal e o peso e volume de água das mamadeiras para cálculo do consumo. Segue abaixo (Tabela 2) a descrição dos grupos de tratamento:

Tabela 2 - Esquema de realização dos procedimentos com a quantidade de animais utilizados e tipo de tratamento por grupo.

Grupo	Quantidade de Animais	Tratamento
1 (Controle)	5	Água de abastecimento do biotério da UCB
2 (Tratado-Naque)	5	Água do Rio Doce
3 (Tratado-Regência)	5	Água da foz do Rio Doce

Os experimentos foram realizados em conformidade com as normas da Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento (SBNeC), baseadas no National Institutes of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals, sendo o projeto submetido ao Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade Católica de Brasília (UCB) e aprovado (Protocolo nº 003/16).

4.2 Etapa analítica

4.2.1 Massa corporal dos animais ao longo do tratamento por grupo

A massa corpórea dos animais foi aferida duas vezes por semana através da pesagem realizada em balança comercial da marca Filizola BP 15 com capacidade de 15 kg, mostrada na figura 2, duas vezes por semana ao longo do tratamento.

4.2.2 Aferição do Peso e Volume da água consumida

Esses procedimentos foram feitos através de pesagem duas vezes por semana em balança comercial da marca Filizola BP 15 (figura 2) do conteúdo restante de água das mamadeiras e aferido o volume em proveta de 500 mL (figura 3).



Figura 4 - Balança Filizola BP 15



Figura 5 - Proveta 500 mL

4.2.3 *Manejo*

Foi realizado o manejo dos animais duas vezes por semana trocando a maravalha das caixas, colocando ração e completando o volume de água para 350 mL, que foi previamente determinado de acordo com o consumo médio citado na literatura, que afirma que um rato adulto, pesando cerca de 300g, consome diariamente uma média de 10 mL de água para cada 100 g de peso corpóreo (CARVALHO, G. D. et al., 2009; SANTOS, M. R. V. et al., 2010).

4.2.4 *Limpeza das caixas*

A limpeza das caixas foi realizada em todos os manejos, raspando-as em câmara de raspagem da marca Insight, modelo EB 120, apresentada na figura 4, com exaustão e em seguida realizada lavagem e posterior autoclavagem das mesmas, em autoclave horizontal da marca Primar, da Linha VS, apresentada figura 5.



Figura 6 - Cabine de raspagem EB120 da marca Insight



Figura 7 - Autoclave da marca primar

4.2.5 Teste comportamental Nado Forçado

Para realização do nado forçado, os animais passaram por um período de treino, 24 horas antes da realização do teste. Para o treino, eles foram colocados individualmente em um recipiente sem apoio lateral ou basal, com cerca de 40 cm de água (fig. 2) a uma temperatura de 24 ± 1 °C, controlada com o auxílio de um termômetro e aquecedor. Após 15 min de nado, os animais foram retirados da água, secados com uma toalha e colocados em uma gaiola individual à temperatura ambiente. Depois de 15min retornaram à gaiola de origem. Após 24 horas da realização do treino, foi feito o teste, que consistiu em colocar o animal novamente no recipiente com água, na mesma temperatura de 24 ± 1 °C, por 5 min, sendo cronometrado o tempo de imobilidade do animal, assim como a latência para a imobilidade, latência para o primeiro movimento, escalada, nadar central, agitar a cabeça, mergulhar e número de bolos fecais. Depois de retirado da água e secado, o animal foi submetido ao teste de campo aberto.



Figura 8 - Fotografia representativa do modelo do nado forçado

4.2.6 Teste comportamental campo aberto

O procedimento consistiu em submeter o animal a uma arena circular, com 60 cm de diâmetro e 50 cm de altura, colocado sobre base acrílica, de forma que o animal não conseguisse escapar. O assoalho, subdividido em 12 secções concêntricas, permitiu a quantificação da atividade motora do animal (figura 7). O animal foi colocado no centro do modelo e os comportamentos foram observados, filmados e cronometrados por um período de 5 min: tempo e frequência de autolimpeza, latência para o primeiro movimento, frequência de ambulação na área junto ao centro, frequência de ambulação na área junto às paredes, frequência de cruzamento entre quadrantes, levantamento, latência para mobilidade e imobilidade e número de bolos fecais. A filmagem foi posteriormente avaliada.

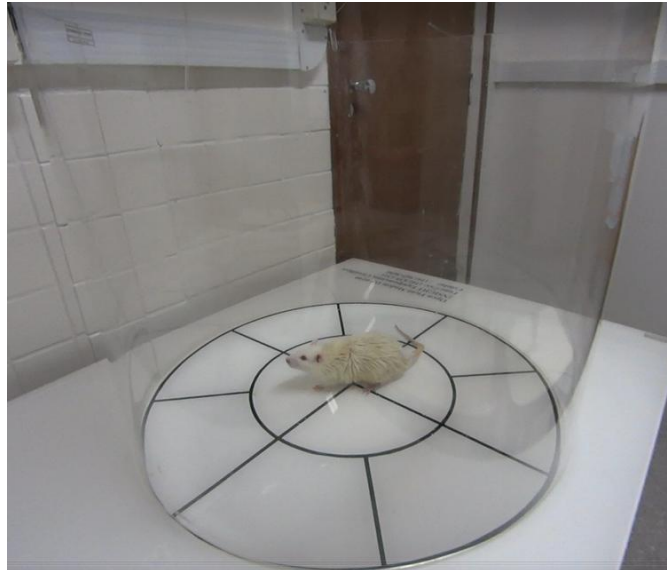


Figura 9 - Fotografia representativa do modelo do campo aberto

4.3 Etapa pós-analítica

4.3.1 Análise estatística

Para a validação dos resultados obtidos, foram criados gráficos demonstrando a massa corporal e a água consumida, além dos comportamentos no teste do nado forçado e no teste do campo aberto pelos grupos durante o tratamento. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média. Foi verificada a distribuição dos dados. O teste estatístico aplicado foi ANOVA com post test Duncan, considerando os dados paramétricos, para verificar diferenças no que se refere ao consumo de água e comportamento entre os grupos. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. Os resultados foram analisados com auxílio do programa GraphPad Prism 6.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A qualidade físico-química da água avaliada pelo GIAIA estava de acordo com o exigido na CONAMA 357/2005 nos parâmetros listados na tabela 3, exceto a turbidez no ponto Naque que pode ser explicada devido a maior presença de sólidos em suspensão, tais como partículas inorgânicas por exemplo os metais provenientes do rompimento da barragem, o que pode ter contribuído para o aumento da concentração dos mesmos e portanto, para os efeitos comportamentais observados.

Tabela 3. Padrões de qualidade exigidos pela legislação e encontrados em expedição do GIAIA nos pontos Naque e Regência

PARÂMETROS	VALORES PERMITIDOS	NAQUE - MÉDIA ± DESVIO PADRÃO	REGÊNCIA - MÉDIA ± DESVIO PADRÃO
DBO 5 dias a 20°C	Até 3 mg/L O ₂	-	-
OD- em qualquer amostra	Não inferior a 6 mg/L O ₂	8,19 ± 0,23 mg/L O ₂	7,66 ± 0,08 mg/L O ₂
Turbidez	Até 40 unidades nefelométrica de turbidez (UNT)	136,67 ± 3,51 UNT	36,33± 12,86 UNT
Cor Verdadeira		-	
pH	6,0 a 9,0	5,81 ± 0,27	7,91±0,08
Clorofila a	Até 10 µg/L	-	-
Densidade de cianobactérias	Até 20.000 cel/mL ou 2 mm ³ /L	-	-
Sólidos dissolvidos totais	Até 500 mg/L	-	-
Coliformes termotolerantes	1.000/ 100 mL em 80% ou mais de pelo menos 6 (seis) amostras.	-	-

O consumo de água ao longo do tratamento foi analisado com intuito de verificar a aceitabilidade da água e a manutenção do padrão de consumo pelos animais, sendo que este se manteve dentro do esperado que é de 10 mL para cada 100g de peso corporal (CARVALHO, G. et al., 2009; SANTOS, M. R. V. et al., 2010), ou 10 a 20 mL/dia (NEVES, S.M.P et al, 2016). Não houve diferença significativa com relação ao peso corporal, sendo que foi possível observar que os animais do grupo de Regência iniciaram o tratamento com maior peso, mas assim como os outros grupos, mantiveram a tendência normal de ganho constante, que inicialmente, se mostrou acelerado e com os dias desacelerou-se gradativamente tendendo a uma relativa estabilidade assintótica (TOMANARI, G. Y., PINE, A. S., SILVA. M. T. A., 2003). Como mostrado na Figura 10.

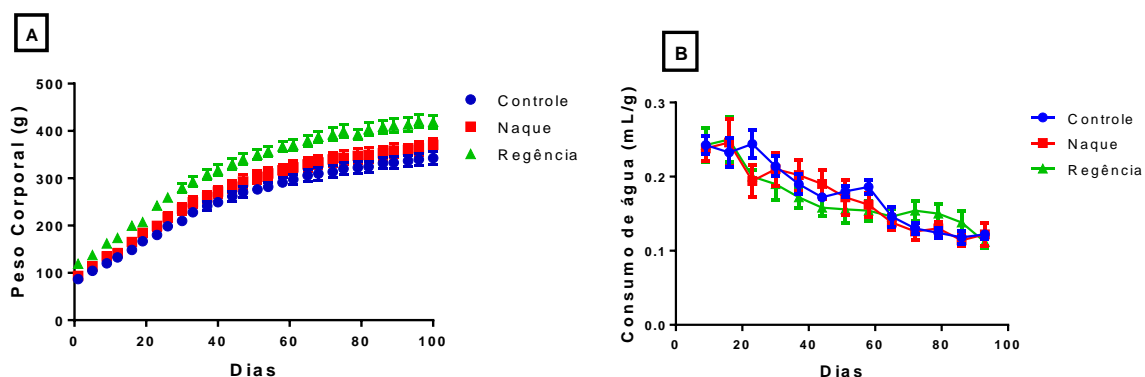


Figura 10 - A. Peso corporal dos animais ao longo do tratamento aferido nos manejos. **B.** Consumo de água semanal aferido nos manejos em mL por g de peso do animal. O EPM foi apresentado pelas barras. Controle-Biotério (n = 5), Naque (n = 5) e Regência (n = 5).

5.1 Nado forçado

Os gráficos mostram os parâmetros avaliados no TNF e os resultados encontrados, por grupo:

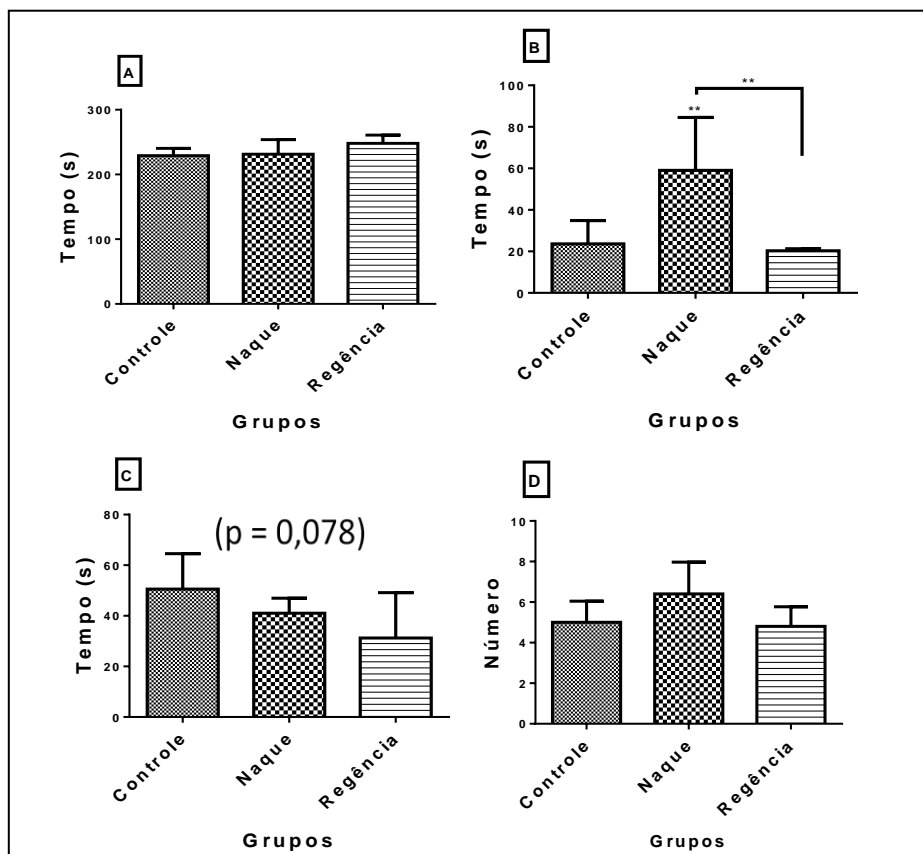


Figura 11 - Efeito da ingestão crônica de águas coletadas de diferentes pontos do rio Doce e do biotério para animais submetidos ao nado forçado sobre: **A.** O tempo de imobilidade (s) **B.** Latência para imobilidade (s) **C.** Tempo de escalada (s) **D.** Bolos fecais. As colunas representam as médias e as barras o EPM. Controle-Biotério (n = 5), Naque (n = 5), Regência (n = 5).

Não foram observadas diferenças significativas no teste do nado forçado, para as variáveis: tempo de mobilidade e imobilidade, latência para o primeiro movimento, escalada, nadar central, agitar a cabeça, mergulhar e número de bolos fecais. Apesar da variável de escalada também não apresentar diferença estatística, apresentou tendência de diferença entre o grupo Naque e controle. A variável latência para a imobilidade apresentou diferença estatística entre os grupos Naque e Controle.

O TNF é um teste importante para a observação de comportamento depressivo e este modelo, além de ser uma situação aversiva e inescapável,

representa para o animal uma ameaça de afogamento e morte eminente, caso não possa manter a cabeça fora da água. (PORSOLT et al., 1977, PORSOLT et al., 1978; CALIL C.M et al., 2002). E levando isso em consideração, o aumento no parâmetro de tempo de imobilidade parece ser o mais consolidado e este reflete um estado depressivo (LUCKI et al., 1997), e talvez por esta razão, seja a única variável medida em muitos estudos utilizando este teste (POSSAMAI, 2013), sendo que de acordo com PORSOLT et al. (1977) este é interpretado como desespero comportamental ou desamparo aprendido.

A latência para a imobilidade é outra variável de suma importância, mas que ao contrário da anterior não é muito avaliada e é raro encontrar trabalhos que descrevam variações na mesma (POSSAMAI, 2013). No entanto, atualmente têm sido feitos trabalhos que descrevem esta, como o de SILVA, F. (2009), o de FERREIRA, F. (2010) e OLIVEIRA, D. (2016) que afirmam que este parâmetro está diretamente relacionado ao efeito depressivo. Levando em consideração que esta variável faz parte do comportamento de imobilidade e que, portanto o grupo Naque obteve maior movimentação, hipóteses são levantadas acerca do comportamento ativo no TNF, sendo uma delas que esta seria um reflexo do tipo de estratégia adotada pelo animal quando se encontra em situação desfavorável, ou ainda um resultado de medo ou ansiedade e representaria uma situação de pânico, característicos de distúrbios psicológicos (DEPABLO et al., 1989, RODRÍGUEZ HINOJOSA, F. O., 2005)

Com relação à escalada esta é relacionada à mobilidade do animal, e quanto maior a mobilidade menor a relação com depressão, EMAMGHOREISHI et al (2009), sendo que neste trabalho foi visto uma tendência a um menor tempo de escalada do grupo Naque em relação ao controle, o que demonstra não haver efeito depressivo, reforçado pelo fato de não ter havido diferença no tempo de imobilidade.

Já os bolos fecais estão relacionados ao medo do animal, sendo que um aumento na produção de bolos fecais no TNF é indicativo de comportamento depressivo (CRAFT et al, 2010; ZANOS et al, 2014), ou mesmo resposta semelhante à ansiedade (AUBRECHT T.G et al, 2014). No entanto, neste trabalho não houve diferença significativa nesta variável entre os grupos.

5.2 Campo Aberto

Os gráficos mostram os parâmetros avaliados no TCA e os resultados encontrados, por grupo:

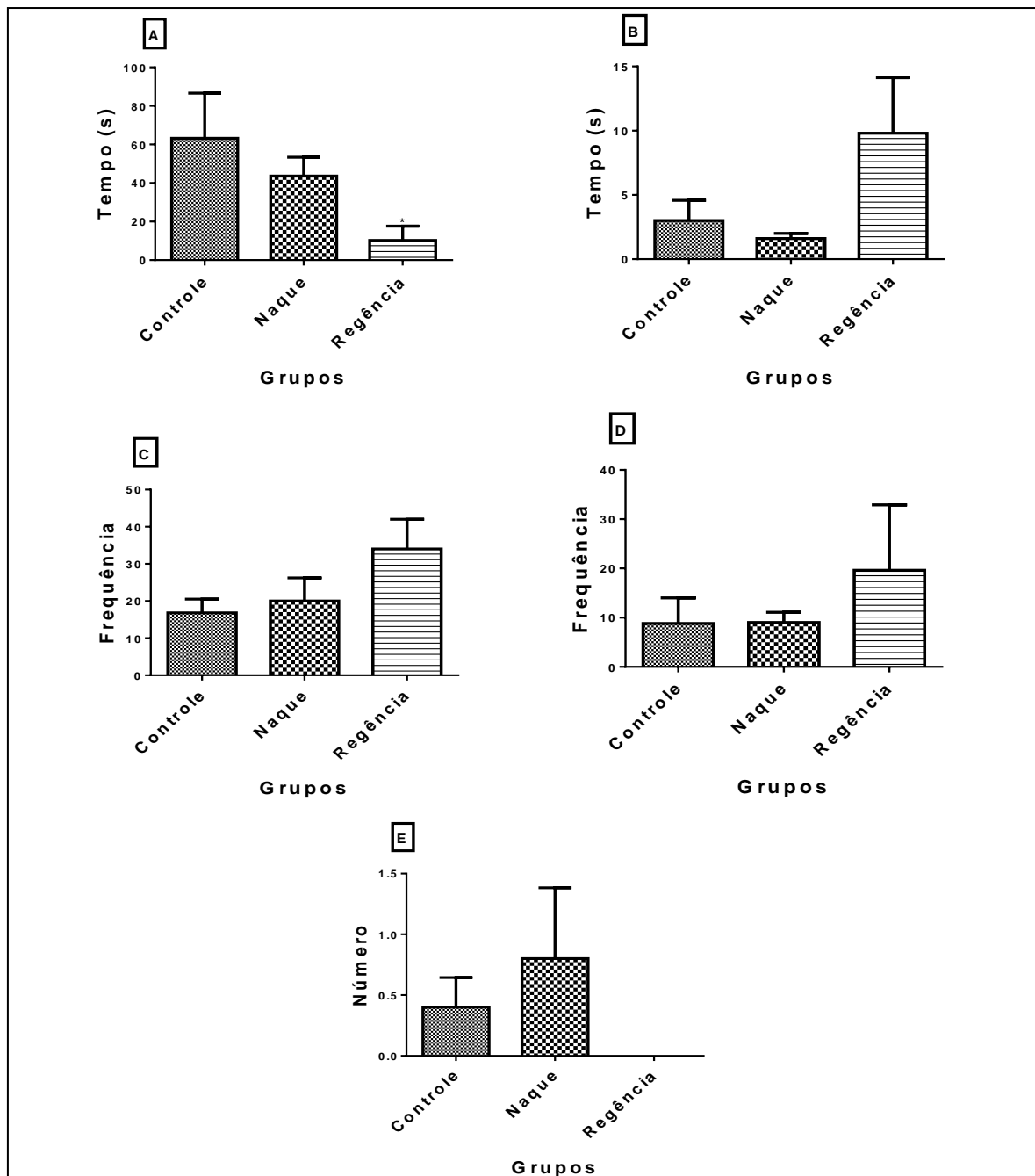


Figura 12 - Efeito da ingestão crônica de águas coletadas de diferentes pontos do rio Doce e do biotério para animais submetidos ao campo aberto, sobre: **A.** Tempo de autolimpeza (s) **B.** Latência para o primeiro movimento (s) **C.** Frequência de transição entre quadrantes. **D.** Frequência de levantamento **E.** Número de bolos fecais. As colunas representam as médias e as barras o EPM. Controle- Biotério (n = 5), Naque (n = 5), Regência (n = 5).

Não foram observadas diferenças significativas no TCA, nas variáveis: latência para o primeiro movimento, frequência de ambulação na área junto ao centro, frequência de ambulação na área junto às paredes, frequência de cruzamento entre quadrantes, levantamento e bolos fecais e frequência de autolimpeza. No entanto, as variáveis de latência para o primeiro movimento, frequência de cruzamento entre quadrantes e levantamento apresentaram tendência de diferença do grupo Regência em relação ao grupo controle. E a variável de tempo de autolimpeza apresentou diferença estatística entre os grupos Regência e Controle.

O comportamento de autolimpeza teve seu tempo estatisticamente reduzido no grupo Regência em relação ao Controle. Alguns autores afirmam que este comportamento é muitas vezes interpretado como um medo/ansiedade, e outros que este seja parte da manutenção do equilíbrio interno e padrão motor com funções adaptativas. Portanto, ainda existe controversa, já que o significado biológico desta ainda não está muito esclarecido, e muitos estudos voltados para a ansiedade ou comportamento em resposta à novidade não a considerem uma variável-alvo (DÍAZ-MOYAHU et al., 1995; RODRÍGUEZ HINOJOSA, F. O., 2005; DÍAZ-MORÁN, S. et al., 2014).

A latência para o primeiro movimento é o tempo que o animal leva para iniciar a movimentação e foi observada uma tendência de diferença entre o grupo Naque e o Controle. Um curto período para o primeiro movimento no campo aberto e um alto nível de atividade pode refletir um baixo nível de ansiedade. (CANARIO, L., RYDHMER, L., 2014).

O comportamento de diminuição das respostas de cruzamentos associado a uma diminuição no número de respostas de levantamento é considerado um efeito sedativo, enquanto que um aumento no número de respostas de levantamento associado a um aumento no número de cruzamentos é considerado um efeito estimulante (CUNHA, M., 2009; PRUT E BELZUNG, 2003). Corroborando o conceito anterior GRAY E MACNAUGHTON (2000) e FIGUEREDO, L. (2010) afirmaram em seus estudos que o levantamento é reduzido em baixos níveis de ansiedade e aumentado em altos níveis da mesma. No entanto, outros pesquisadores como HABR S.F. et al (2011), OYEKUNLE O., IBIRONKE G., OPABUNMI, O (2012) e DÍAZ-MORÁN, S. et al. (2014) afirmaram que o número de cruzamentos e a frequência de levantamentos são medidas de atividade locomotora, exploração e

ansiedade e que estas quando diminuídas estariam relacionadas a altos níveis de emocionalidade em ratos e quando aumentadas indicariam locomoção e exploração.

Em relação à defecação HALL (1934) mostrou que quando ratos eram expostos a um ambiente estranho, a defecação e o ato de urinar seriam índices de um estado emocional. O medo causa no roedor submetido a um estímulo estressor, como o campo aberto, uma tendência a “congelar”, defecar e urinar. Alguns estudos demonstram uma correlação inversamente negativa entre ambulação e defecação, o que foi encontrado neste estudo. Outros discordam, e afirmam haver decréscimo tanto na ambulação quanto na defecação e não uma correlação inversa (LACERDA G., 2006).

6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

A soma dos resultados dos parâmetros do teste do nado forçado sugere que houve mudanças leves no comportamento, sem indício de atividade pró-depressiva em nenhum dos grupos em relação ao controle, mas que não exclui a toxicidade dos metais encontrados na água.

A soma dos resultados dos parâmetros do teste do campo aberto sugere que houve mudanças leves no comportamento, sem indício de atividade ansiogênica em nenhum dos grupos em relação ao controle, mas que não exclui a toxicidade dos metais encontrados na água.

É importante ressaltar que este é um estudo piloto e que os dados apresentados são preliminares, tendo em vista que este é parte de uma tese de mestrado e sendo assim outras avaliações e testes serão realizados, como estresse oxidativo e quantificação dos metais em soro e tecidos desses animais, o que pode proporcionar maiores esclarecimentos com relação aos resultados deste trabalho.

Além disso, é importante salientar que o tratamento pode não ter durado tempo suficiente para provocar efeitos de toxicidade crônica, já que as concentrações de metais encontrados no Rio Doce têm potencial para desencadear intoxicações crônicas e em humanos, tais efeitos, podem levar décadas para serem bem evidenciados.

Ademais, no futuro outros pesquisadores podem dar continuidade a este trabalho utilizando testes mais específicos para ansiedade e não só comportamentais, mas também a investigação de mecanismos específicos de geração dos danos causados pelos metais, que são responsáveis pelos comportamentos aqui estudados e levando em consideração a possibilidade de aumentar o número de animais por grupo e incluir um grupo controle positivo para observar resposta estatística mais clara.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEYEMI, JOSEPH A; DA CUNHA MARTINS-JUNIOR, AIRTON; BARBOSA, F. Teratogenicity, genotoxicity and oxidative stress in zebrafish embryos (*Danio rerio*) co-exposed to arsenic and atrazine. *Comparative Biochemistry and Physiology. C. Toxicology & Pharmacology*, v. 173, p. 500-505, 2015.

ALTMANN, P. et al. Disturbance of cerebral function in people exposed to drinking water contaminated with aluminium sulphate: retrospective study of the Camelford water incident. **BMJ : British Medical Journal**, v. 319, n. 7213, p. 807-811, 1999.

ALZHEIMER'S ASSOCIATION. Disponível em: http://www.alz.org/brain_portuguese/11.asp. Acesso em: 28 set 2016.

AUBRECHT, T. G.; WEIL, Z. M.; NELSON, R. J. Melatonin treatment during early life interacts with restraint to alter neuronal morphology and provoke depressive-like responses. **Behav Brain Res**, v. 263, p. 90-7, Apr 15 2014.

BARRA, C.M, SANTELLI, R.E, ABRÃO, J.J. Especificação de Arsênio - Uma revisão. **Quím. Nova**, v.23, n.1, São Paulo, Jan./Feb, 2000.

BOUCHARD, M. et al. Hair Manganese and Hyperactive Behaviors: Pilot Study of School-Age Children Exposed through Tap Water. **Environmental Health Perspectives**, v. 115, n. 1, p. 122-127, 2007.

BOUCHARD MF, SAUVÉ S, BARBEAU B, LEGRAND M, BRODEUR MÈ, BOUFFARD T, et al. Intellectual impairment in school-age children exposed to manganese from drinking water. *Environ Health Perspect*, v. 119, n. 1, p 138-143, 2011.

BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B. J. As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman & Gilman. Porto Alegre: AMGH, 2012.

CALIL C.M et al. Análise do significado do tempo de imobilidade em modelos experimentais de natação. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, São Paulo , v. 38, n. 4, p. 479-485, Dec. 2002 .

CALOU, I.B.F., CERQUEIRA, G.S., SIQUEIRA, R. M. P. Neurotoxicidade do ferro na fisiopatologia da doença de Parkinson. **Revista Intertox-Eco Advisor de Toxicologia Risco Ambiental e Sociedade**, v. 8, n. 1, p. 45-57, fev. 2015.

CANARIO, L., RYDHMER, L.. Chapter 11 - Behavioral Genetics in Pigs and Relations to Welfare, Genetics of Domesticated Behavior in Dogs and Foxes A2 - Grandin, Temple. In: DEESING, M. J. (Ed.). **Genetics and the Behavior of Domestic Animals (Second Edition)**. San Diego: Academic Press, 2014. p.361-396. ISBN 978-0-12-394586-0.

CARDOSO, L. M. N.; CHASIN, A. A. M. Ecotoxicologia do cádmio e seus compostos. **Série Cadernos de Referência Ambiental**, v.6. 1.ed. Salvador: Centro de Recursos Ambientais. 121p. 2001.

CARVALHO, G.D et al. Avaliação clínica de ratos de laboratório (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar): parâmetros sanitários, biológicos e fisiológicos. **Ceres**, v.56, n.1, p.51-57, 2009.

CONAMA 357 de 2005. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=459>>. Acesso em: 30 ago 2016.

CORTECCI G. GEOLOGIA E SAÚDE. Disponível em: <http://www.cprm.gov.br/publique/media/geosaude.pdf>. Acesso em: 22 set. 2016.

CRAFT, R. M. et al. Forced swim test behavior in postpartum rats. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 96, n. 4, p. 402-412, 2010.

CUNHA, M. P. Interação do zinco com antidepressivos no teste de suspensão da cauda e no teste do campo aberto. 2009. Florianópolis, SC

DAS, K. K.; DAS, S. N.; DHUNDASI, S. A. Nickel, its adverse health effects & oxidative stress. **Indian Journal of Medical Research**, v. 128, p. 412, 2008.

DÍAZ-MORÁN, S. et al. Relationships of open-field behaviour with anxiety in the elevated zero-maze test: Focus on freezing and grooming. **World Journal of Neuroscience**, v.4, p. 1-11, 2014.

DE PABLO JM, Parra A, Segovia S, Guillamón A. Learned immobility explains the behavior of rats in the forced swimming test. **Physiol Behav**. 1989;46(2):229–37.

DI PAOLO, C. et al. Chronic exposure to aluminum and melatonin through the diet: Neurobehavioral effects in a transgenic mouse model of Alzheimer disease. **Food and Chemical Toxicology**, v. 69, p. 320-329, 2014.

DONG, C. Protective Effect of Proanthocyanidins in Cadmium Induced Neurotoxicity in Mice. **Drug research**, v. 65, n. 10, p. 555-560, 2015.

DRAGO, D. et al. Potential pathogenic role of beta-amyloid(1-42)-aluminum complex in Alzheimer's disease. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 40, n. 4, p. 731-46, 2008.

DUARTE, A. P. **CLASSIFICAÇÃO DAS BARRAGENS DE CONTENÇÃO DE REJEITOS DE MINERAÇÃO E DE RESÍDUOS INDUSTRIAIS NO ESTADO DE MINAS GERAIS EM RELAÇÃO AO POTENCIAL DE RISCO**. 2008. 117 Mestrado, UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, Belo Horizonte-MG.

EMAMGHOREISHI , M; TALEBIANPOUR, M.S. Antidepressant effect of *Melissa officinalis* in the forced swimming test. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, [S.l.], p. 42-47, 2009.

EMBRAPA. Tragédia em Mariana: produção agropecuária em áreas atingidas está comprometida. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/8410974/tragedia-em-mariana-producao-agropecuaria-em-areas-atingidas-esta-comprometida>. Acesso em: 15 mar. 2016.

ERIKSON, K. M.; THOMPSON, K.; ASCHNER, J.; ASCHNER, M. Manganese Neurotoxicity: A Focus on the Neonate. **Pharmacol Ther.**, v. 113, n. 2, p. 369–377, fev. 2007.

FARHAT, S. M. et al. Aluminum-Induced Cholinergic Deficits in Different Brain Parts and Its Implications on Sociability and Cognitive Functions in Mouse. **Biol Trace Elem Res**, Oct 6 2016.

FERREIRA, F. G. Avaliação das atividades ansiolítica e antidepressiva dos óleos essenciais de *Mentha piperita* L. e *Cananga odorata* Hook. f. & Thomson em camundongos, por via inalatória. L. 2010. 81 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas - Farmacologia) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu.

FIGUEREDO, L. Z. P. **Memória emocional de ratos selecionados no campo aberto em alto e baixo rearing: aquisição, consolidação e extinção no condicionamento de medo**. 2010. Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP)

FUNCHAL, C. D. S. D., CAROLINE. **Neurociências: modelos experimentais em animais**. Porto Alegre: EdUPUCRS, Editora Universitária Metodista, 2014.

GAGNAIRE B, ADAM-GUILLERMIN C, BOURON A, LESTAEVEL P. The effects of radionuclides on animal behavior. **Rev Environ Contam Toxicol**, v. 210, p. 35–58, 2011.

GIAIA. RELATÓRIO-TÉCNICO DETERMINAÇÃO DE METAIS NA BACIA DO RIO DOCE (PERÍODO: DEZEMBRO-2015 A ABRIL-2016). Disponível em:<http://giaia.eco.br/wp-content/uploads/2016/06/Relatorio-GIAIA_Metais_Vivian_revisto5.pdf> Acesso em: 20 ago 2016.

GIAIA. ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DO RIO DOCE E AFLUENTES ANÁLISES REALIZADAS IN SITU GIAIA – 2ª EXPEDIÇÃO À BACIA DO RIO DOCE (30/03 A 08/04/16). Disponível em: <http://giaia.eco.br/wp-content/uploads/2016/06/Relatorio-GIAIA_Metais_Vivian_revisto5.pdf> Acesso em: 20 ago 2016.

GIASSON BI et al. The environmental toxin arsenite induces tau hyperphosphorylation, **Biochemistry**, v.41, n.51, p. 15376–87, 2002.

GONG G et al. Low-level groundwater arsenic exposure impacts cognition: a project FRONTIER study. **J Environ Health.**, v.64, n. 2, p. 16–22, 2011.

GRAZULEVICIENE, R. et al. Effects of elevated levels of manganese and iron in drinking water on birth outcomes. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 18, n. 5, p. 819-825, 2009.

GRAY A, MCNAUGHTON N. The neuropsychology of anxiety: an enquiry into the functions of septo-hippocampal system. Oxford: Oxford University Press; 2000.

HABR, Soraya Ferreira et al . Open field behavior and intra-nucleus accumbens dopamine release in vivo in virgin and lactating rats. **Psychol. Neurosci. (Online)**, Rio de Janeiro , v. 4, n. 1, p. 115-121, June 2011

HALL, C. S. Emotional behavior in the rat. Defecation and urination as measures of individual differences in the emotionality. *J Comp Psychol*, v.18, n.3, p.385-403. 1934.

HE, M.-D. et al. L-carnitine protects against nickel-induced neurotoxicity by maintaining mitochondrial function in Neuro-2a cells. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 253, n. 1, p. 38-44, 5/15/ 2011.

IARC (Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans)-LIST OF CLASSIFICATIONS, VOLUMES 1–116.
http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/latest_classif.php

IBAMA. Relatório de parecer técnico sobre os resultados obtidos nas coletas de amostras de água e sedimento no rio doce e na região da foz, no estado do espírito santo. Disponível em:<
http://www.ibama.gov.br/phocadownload/noticias_ambientais/relatorio_analise_agua_marco.pdf>. Acesso em: 01 set 2016.

IBRAM¹. A Indústria da Mineração em Minas Gerais. Disponível em:
<http://www.ibram.org.br/sites/1300/1382/00000177.pdf>. Acesso em: 15 mar. 2016

IBRAM². Informações sobre a Economia Mineral do Estado de Minas Gerais. Disponível em: <http://www.ibram.org.br/sites/1300/1382/00004355.pdf>. Acesso em: 15 mar. 2016

IGAM. Monitoramento da qualidade das águas superficiais do rio doce no estado de minas gerais. Disponível em:<
http://www.igam.mg.gov.br/images/stories/2016/QUALIDADE/Relatorio_Monitoramento_Emergencial_Rio_Doce_01_08_2016.pdf>. Acesso em: 01 set 2016.

JAIN, A.; AGRAWAL, S.; FLORA, S. J. S. Arsenic and nicotine co-exposure lead to some synergistic effects on oxidative stress and apoptotic markers in young rat blood, liver, kidneys and brain. **Toxicology Reports**, v. 2, p. 1334-1346, 2015.

KAMEL, M M., RAZEK, A. H.A.E, KAMEL, G.M . Exposure of Adult Male Rats to Cadmium: Assessment of Sexual Behaviour, Fertility, Aggression as well as Anxiety like Behaviour with Special Reference to Biochemical and Pathological Alterations, **Life Science Journal**, , v. 8, n.2, p. 106-119, 2011.

KLAASSEN, C. D.; WATKINS III, J. B. Fundamentos em toxicologia de Casarett e Doull. 2. ed. Porto Alegre: AMGH, 2012. 472p. (Lange).

LACERDA, G. F. M. L. D. **ANSIEDADE EM MODELOS ANIMAIS: EFEITO DE DROGAS NAS DIMENSÕES EXTRAÍDAS DA ANÁLISE FATORIAL**. 2006. Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Paraná, RS.

LOTTERMOSER, B. G. **Mine Wastes: Characterization, Treatment, Environmental Impacts**. YORK, S. B. H. N. Cairns, Queensland 4870, Australia: 311 p. 2007.

LUCKI, I. The forced swimming test as a model for core and component behavioral effects of antidepressant drugs. **Behav. Pharmacol.**, Philadelphia, v. 8, n. 6-7, p. 523-532, 1997.

MARTYN, C. N. et al. GEOGRAPHICAL RELATION BETWEEN ALZHEIMER'S DISEASE AND ALUMINIUM IN DRINKING WATER. **The Lancet**, v. 333, n. 8629, p. 61-62, 1989.

MECHI, A.; SANCHES, D. L. Impactos ambientais da mineração no Estado de São Paulo. **Estudos Avançados**, v. 24, p. 209-220, 2010.

MONEIM, A. E. A. et al. The protective effect of *Physalis peruviana* L. against cadmium-induced neurotoxicity in rats. **Biological trace element research**, v. 160, n. 3, p. 392-399, 2014.

MOON C, MARLOWE M, STELLERN J, ERRERA J. Main and interaction effects of metallic pollutants on cognitive functioning. *J Learn Disabil*. 1985;18(4):217–221.

MOYAHU, A.; EGUIBAR, J.R.; DIAZ, J.L. Induced grooming transitions and open field behaviour differ in high- and low-yawning sublines of Sprague-Dawley rats. *Animal Behavior*, 50: 61-72; 1995.

NAHAR, M. N, INAOKA, T., FUJIMURA, M. A consecutive study on arsenic exposure and intelligence quotient (IQ) of children in Bangladesh. **Environ Health Prev Med**, vol.19, p. 194–199, 2014.

NEVES, S.M.P et al. Manual de Cuidados e Procedimentos com Animais de Laboratório do Biotério de Produção e Experimentação da FCF-IQ/USP. Disponível em: <<http://www.fo.usp.br/wp-content/uploads/Manual-Cuidados-com-Animais.pdf>>. Acesso em: 21 ago 2016.

NETO, A. A. A. et al. Informe Mineral 2º/2014. 2014. Disponível em: <http://www.dnrm.gov.br/dnrm/informes/informe_mineral_2014-02.pdf>. Acesso em: 21 maio 2016.

OLIVEIRA, D. R. D. **AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE TIPO ANTIDEPRESSIVA DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *Spiranthera odoratissima* A. ST.-HIL. E DE SEU COMPONENTE MAJORITÁRIO, β -CARIOFILENO**. 2016. Mestrado Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia.

ORGANON, Núcleo de Estudo, Pesquisa e Extensão em Mobilizações Sociais. Impactos socioambientais no Espírito Santo da ruptura da barragem de rejeitos da Samarco - Relatório preliminar. Novembro / dezembro. Mimeo. 2015. Disponível em:<

http://www.ufes.br/sites/default/files/anexo/relatorio_de_impactos_organon.asd_.pdf>
Acesso em: 29 jul 2016.

OYEKUNLE, Olanrewaju Akinloye; IBIRONKE, Goke Francis; OPABUNMI, Oluwale Adebayo. Relationship between circulating testosterone and emotional behavior in rats. **Psychol. Neurosci.**, Rio de Janeiro , v. 5, n. 1, p. 113-116, June 2012.

POHL, H., RONEY, N., ABADIN, H. Metal Ions Affecting the Neurological System. Disponível em: <
https://www.researchgate.net/profile/Hana_Pohl/publication/51032706_Metal_ions_affecting_the_neurological_system/links/0c96052a21d8804bae000000.pdf>. Acesso em: 20 set 2016.

PORSOLT, R. D., LePICHON, M., JALFRE, M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature*, London, v. 266, n. 5604, p. 730- 32, 1977

PORSOLT, R. D., BETIN, A., JALFRE, M. "Behavioral despair" in rats and mice: strain differences and the effect of imipramine. *Eur. J. Pharmacol.*, Amsterdam, v. 51, n. 3, p. 291-294, 1978

POSSAMAI, F. **TESTE DO NADO FORÇADO REPETIDO: AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA IMIPRAMINA SOBRE O COMPORTAMENTO E A NEUROGÊNESE HIPOCAMPAL DOS RATOS ALOJADOS EM AMBIENTE ENRIQUECIDO**. 2013. Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de Santa Catarina Florianópolis.

PORTO, Marcelo Firpo de Souza. A tragédia da mineração e do desenvolvimento no Brasil: desafios para a saúde coletiva. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro , v. 32, n. 2, e00211015, 2016 . Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-311X2016000200302&lng=en&nrm=iso>. access on 11 Oct. 2016. Epub Mar 11, 2016. <http://dx.doi.org/10.1590/0102-311X00211015>.

PRUT, L. AND BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: A review. **European Journal of Pharmacology**, v. 463, p. 3-33, 2003.

RODRIGUES, C. D. P.; COSTA, E. R. D. Informações da Economia Mineral Brasileira 2015. v. 2016, n. 21/05/2016, 2015.

RODRÍGUEZ HINOJOSA, F. O. **Estudo comportamental de dois modelos genéticos para a emocionalidade**. 2005. Florianópolis, SC.

ROY A et al. Association between arsenic exposure and behavior among first-graders from Tlaxcala, Mexico. **Environ Res.**, v. 111, n. 5, p.670-676, 2011.

SANTOS, D. A. M., ADILSON CURI , JOSÉ MARGARIDA DA SILVA. Técnicas para a disposição de rejeitos de minério de ferro. 2010. Disponível em: <http://www.cbmina.org.br/media/palestra_6/T54.pdf >. Acesso em: 30/08/2016.

SANTOS, M. R. V. et al. Parâmetros bioquímicos, fisiológicos e morfológicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) produzidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Sergipe. **Scientia Plena**, v.6, n.10, p.1-6, 2010.

SHAGIRTHA, K.; MUTHUMANI, M.; PRABU, S. M. Melatonin abrogates cadmium induced oxidative stress related neurotoxicity in rats. **Eur Rev Med Pharmacol Sci**, v. 15, n. 9, p. 1039-50, Sep 2011.

SARITHA, K.; CELIA, D. A.; SHAHRYAR, H. K.; NIKOLAY, F. M. Brain deposition and neurotoxicity of manganese in adult mice exposed via the drinking water. **Arch Toxicol**. v. 88, n. 1, p. 47-64, 2014.

SEGURA, F. R. et al. Potential risks of the residue from Samarco's mine dam burst (Bento Rodrigues, Brazil). **Environmental Pollution**, v. 218, p. 813-825, 11// 2016.

SILVA, F. M. D. **Efeitos ansiogênicos e antidepressivos da ativação farmacológica aguda de receptores 5-HT_{2c} em modelos animais de ansiedade e depressão**. 2009. Mestrado Departamento de Processos Psicológicos Básicos, Universidade de Brasília, Instituto de Psicologia, Brasília.

SILVA, J. P. S. Impactos ambientais causados por mineração **Espaço da Sophia**, n. 8, 2007.

SIZER, F. S.; WHITNEY, E. N.; HAMILTON, E. M. N. **Hamilton/Whitney's nutrition : concepts and controversies**. 6th ed. / Frances Sienkiewicz Sizer, Eleanor Noss Whitney. Minneapolis/St. Paul: West Pub. Co, 1994. ISBN 0314026924

SOS MATA ATLÂNTICA. Laudo técnico parcial – Expedição Bacia do Rio Doce. Disponível em:< <http://www.ibama.gov.br/publicadas/documentos-do-ibama-sobre-o-desastre-da-samarco-no-rio-doce>>. Acesso em: 01 set 2016.

THE INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY. Disponível em: <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc134.htm>. Acesso em: 01 set. 2016.

TOMANARI, G. Y.; PINE, A. S.; SILVA, M. T. A. Ratos wistar sob regimes rotineiros de restrição hídrica e alimentar. **Revista Brasileira de Terapia Comportamental e Cognitiva**, São Paulo, v. 5, n. 1, p. 57-71, 2003.

VAHIDNIA, A.; VAN DER VOET, G. B.; DE WOLFF, F. A. Arsenic neurotoxicity — A review. **Human & Experimental Toxicology**, v. 26, n. 10, p. 823-832, October 1, 2007 2007.

VIEIRA, E. A. A (in) sustentabilidade da indústria da mineração no Brasil. **2011**, v. 1, n. 2, p. 15, 2011-10-14 2011.

VYSKOCIL, A. et al. Biochemical renal changes in workers exposed to soluble nickel compounds. **Toxicology Letters**, v. 74, p. 92, 1994/08/01 1994.

WASSERMAN, G. A. et al. Water Manganese Exposure and Children's Intellectual Function in Araihaazar, Bangladesh. **Environmental Health Perspectives**, v. 114, n. 1, p. 124-129, 2006.

WASSERMAN, Gail A. et al. Water Arsenic Exposure and Intellectual Function in 6-Year-Old Children in Araihasar, Bangladesh. **Environmental Health Perspectives**, v. 115, n.2, p. 285-289, 2007.

WASSERMAN, G. A. et al. Arsenic and manganese exposure and children's intellectual function. **Neurotoxicology**, v. 32, n. 4, p. 450-457, 2011.

WEGRZYNOWICZ, M.; HOLT, H. K.; FRIEDMAN, D. B.; BOWMAN, A. B. Changes in the striatal proteome of YAC128Q mice exhibit gene-environment interactions between mutant Huntingtin and manganese. **J Proteome Res**, v. 11, n. 2, p. 1118-1131, 2013.

WEST, C. H. K.; WEISS, J. M. A selective test for antidepressant treatments using rats bred for stress-induced reduction of motor activity in the swim test. **Psychopharmacology**, v. 182, n. 1, p. 9-23, 2005.

YAMAGATA, A. T. et al. Gender influence on manganese induced depression-like behavior and Mn and Fe deposition in different regions of CNS and excretory organs in intraperitoneally exposed rats. **Toxicology**, 2016.

ZANOS, P. et al. The Oxytocin Analogue Carbetocin Prevents Emotional Impairment and Stress-Induced Reinstatement of Opioid-Seeking in Morphine-Abstinent Mice. **Neuropsychopharmacology**, v. 39, n. 4, p. 855-865, 2014.

ZATTA, P. et al. Alzheimer's disease, metal ions and metal homeostatic therapy. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 30, n. 7, p. 346-355, 7// 2009.

8 ANEXO 1



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **“Avaliação da neurotoxicidade da água do Rio Doce após rompimento da barragem Fundão em ratos tratados cronicamente”**, registrada com o nº **003/16**, sob a responsabilidade de Vívian da Silva Santos - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA/UCB) da Universidade Católica de Brasília, em reunião de 20 / 09 / 2016.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	12 de dezembro de 2017.
Espécie / linhagem/ raça	<i>Rattus Norvegicus/ Wistar</i>
Nº de Animais	25
Peso / Idade	60g / 21 Dias
Sexo	Macho
Origem	Biotério do Laboratório de Processos Básicos em Psicologia (UCB)

Brasília, 20 de Setembro de 2016.

Prof.^a Juliana Lott de Carvalho
 Coordenadora da Comissão de Ética
 Em Uso de Animais/UCB
 Universidade Católica de Brasília